

201231059A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と
網羅的解析に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤枝 重治

平成25(2013)年5月

目 次

I. 研究組織	-----	1
II. 総括研究報告		
1. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究 藤枝 重治	-----	3
III. 分担研究報告		
1. 好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥満細胞の役割に関する研究 高林 哲司	-----	11
2. RNA-Seqを用いた好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定に関する研究 野口 恵美子	-----	16
3. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究 玉利 真由美	-----	19
4. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究（Ⅰ～Ⅲ） 池田 勝久	-----	24
5. 好酸球性副鼻腔炎患者の好酸球性中耳炎発症のリスク因子の解析 飯野 ゆき子	-----	30
6. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成に関する研究 石戸谷 淳一	-----	34
7. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究 河田 了	-----	37
8. 重症好酸球性副鼻腔炎の臨床的研究 春名 眞一	-----	39
9. 慢性好酸球性炎症疾患の遺伝子解析と蛋白質解析に関する研究 平川 勝洋	-----	43
10. 再発性副鼻腔炎に関する研究 川内 秀之	-----	49
11. 慢性副鼻腔炎における緑膿菌の感染経路に関する研究 氷見 徹夫	-----	53
12. 鼻茸における好酸球性炎症の歴史的変遷に関する研究 岡野 光博	-----	56
13. 慢性副鼻腔炎の術後管理と予後に関する研究 吉川 衛	-----	60
14. 好酸球性鼻茸病態におけるIDO(Indoleamine 2,3-dioxygenase)と 各種サイトカインの関与 谷口 正実	-----	65

研究代表者

藤 枝 重 治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学・教授

研究分担者

飯野 ゆき子 自治医科大学附属さいたま医療センター・耳鼻咽喉科・教授
池田 勝久 順天堂大学医学部・耳鼻咽喉科・教授
石戸谷 淳一 横浜市立大学 附属市民総合医療センター・耳鼻咽喉科・教授
浦島 充佳 東京慈恵会医科大学・分子疫学・准教授
鴻 信義 東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科・准教授
岡野 光博 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・耳鼻咽喉・頭頸部外科学
・准教授
川内 秀之 島根大学医学部・耳鼻咽喉科・教授
河田 了 大阪医科大学・耳鼻咽喉科・教授
谷口 正実 国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部
・部長
玉利 真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター 呼吸器疾患研究チーム
・チームリーダー
野口 恵美子 筑波大学人間総合科学研究科社会環境医学専攻遺伝医学分野・
人類遺伝学・准教授
春名 眞一 獨協医科大学医学部・耳鼻咽喉・頭頸部外科・教授
氷見 徹夫 札幌医科大学・耳鼻咽喉科・教授
平川 勝洋 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学
・教授
吉川 衛 東邦大学医学部・耳鼻咽喉科・講師
坂下 雅文 福井大学医学部附属病院・耳鼻咽喉科・頭頸部外科・助教

研究協力者

池田 浩己 日本赤十字社和歌山医療センター・耳鼻咽喉科
吉田 尚弘 自治医科大学附属さいたま医療センター・耳鼻咽喉科
金沢 弘美 自治医科大学附属さいたま医療センター・耳鼻咽喉科
佐久間 康徳 横浜市立大学 附属市民総合医療センター・耳鼻咽喉科
塩野 理 横浜市立大学 附属市民総合医療センター・耳鼻咽喉科
春名 威範 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・耳鼻咽喉・頭頸部外科学
野山 和廉 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・耳鼻咽喉・頭頸部外科学

青井 典明	島根大学医学部・耳鼻咽喉科
森倉 一朗	島根大学医学部・耳鼻咽喉科
清水 保彦	島根大学医学部・耳鼻咽喉科
清水 香奈子	島根大学医学部・耳鼻咽喉科
淵脇 貴史	島根大学医学部・耳鼻咽喉科
田村 優希江	島根大学医学部・耳鼻咽喉科
寺田 哲也	大阪医科大学・耳鼻咽喉科
鈴木 倫雄	大阪医科大学・耳鼻咽喉科
広田 朝光	理化学研究所ゲノム医科学研究センター 呼吸器疾患研究チーム
中山 元次	獨協医科大学・耳鼻咽喉・頭頸部外科
関 伸彦	札幌医科大学・耳鼻咽喉科
竹野 幸夫	広島大学大学院医歯薬保健学研究院 耳鼻咽喉科学・頭頸部外科学
石野 岳志	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
野田 礼彰	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
福入 隆史	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
樽谷 貴之	広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
松脇 由典	東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科
浅香 大也	東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科
大櫛 哲史	東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科
東 憲孝	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部
三田 晴久	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部
石井 豊太	国立病院機構相模原病院・耳鼻咽喉科
梶原 景一	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部
三井 千尋	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部
伊藤 潤	国立病院機構相模原病院アレルギー科
渡井 健太郎	国立病院機構相模原病院アレルギー科
南 崇史	国立病院機構相模原病院アレルギー科
林 浩昭	国立病院機構相模原病院アレルギー科
伊藤 伊津子	国立病院機構相模原病院臨床研究センター病態総合研究部
高林 哲司	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
意元 義政	福井大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科
徳永 貴広	福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業))
総括研究報告書

好酸球性副鼻腔炎の診断基準作成と網羅的解析に関する研究

研究代表者 藤 枝 重 治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
研究分担者 坂 下 雅 文 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
意 元 義 政 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

研究要旨

これまで本邦で多かった好中球浸潤優位の慢性副鼻腔炎にかわって、好酸球浸潤が著明な好酸球性副鼻腔炎 (Eosinophilic chronic rhinosinusitis: ECRS) が増加してきた。この副鼻腔炎は、難治性でステロイド内服のみが有効であるが、発症機序は不明であり、病態の理解も曖昧であった。H22年に全国11共同研究施設で過去3年間の副鼻腔炎手術症例3014例(うちECRS 27.6%)を解析検討し、ECRSに対する整数の重み付け診断基準案を作成した。これは8項目の臨床データからなるが、最終にスコア5点以上がECRSであると術前に判定すると、感度76%、特異度72%となった。この基準をもとに2年間(H23~24年)の手術症例を対象に、前向き研究を行った。これは診断基準から術前にECRSを診断し、組織結果とともに最終確認をしてその有用性を判断するものである。これまで574例の登録があり、うち33.8%がECRSであった。その結果、ECRSでも短期間で再発をきたす重症群と一般的副鼻腔炎のように順調な経過をたどる軽症群に分かれることが判明した。そこで再度、H22年に集めた3014例の予後調査を行い、重症群とそれ以外の違いを統計学的に検討している。一方で、ステロイド以外に有効な治療手段がないECRSの新しい治療法を確立することも重要である。標的分子として、鼻茸の網羅的蛋白解析から得られたL-plastin、上皮から産生し自然免疫に重要なTSLPとIL-33、マイクロアレーからCCL18とCCL26、Indoleamine 2,3-deoxygenase、IL-17、ヘモオキシゲナーゼが新たに見出された。また鼻腔一酸化窒素や尿中LTE4、PGD2、リポキシンA4を臨床マーカーとして使用できる可能性も見出し、CTや末梢中好酸球率をベースにした慢性副鼻腔炎分類案なども提案できた。これらの成果は日本鼻科学会、日本耳鼻咽喉科学会、日本呼吸器学会、各種研究会で代表者および分担者が発表したとともに、鼻アレルギー診療ガイドライン、喘息予防・管理ガイドラインにも記載した。

A. 研究目的

好中球浸潤を主体とする慢性副鼻腔炎が本邦の特徴であったが、最近好酸球浸潤を主体とし、成人発症で気管支喘息を伴い、嗅覚脱失に至るステロイドにしか反応しない好酸球性副鼻腔炎が増加してきた。進行すると好酸球浸潤は中耳にまで進展し、聾に至る。唯一、効果の

あるステロイド内服も本疾患が致死的疾患でないため長期の服用は行えず、休薬中に炎症が悪化してしまう。一方で感覚神経障害(嗅覚神経・聴神経)が必発なため通院が終わることはなく、費やされる医療費は膨大なものである。これらの疾患に悩む患者、臨床医の数は増加しているが、大規模調査は行われておらず、有病

率などはっきりしたことはわかっていない。この疾患が成人発症であることから、今後確実に増えていくと思われ、ガイドライン作成とともに病因を解明し、青少年期からの予防対策が厚生労働行政には必須である。

平成 22 年度事業において全国 12 施設から平成 19~21 年度の副鼻腔炎手術 3014 症例の組織標本と臨床データを回収した。全組織標本中の好酸球数測定を終了し、各臨床項目との関係を多変量解析し、ガイドライン作成に向けた重み付けを行った。その結果、年齢 15 歳未満：-3 点、70 歳以上：-1 点 両側病変あり：+1 点、鼻茸あり：+1 点、嗅裂閉鎖あり：+1 点、薬物アレルギーあり：+1 点、篩骨洞陰影優位：+1 点、血中好酸球率が 3-5%：+2 点、5-8%：+3 点、8%以上：+4 点の重み付けを決定した。しかしこの診断基準は、すでに病理組織が存在する状態で、あとから診断をした症例から得られたもので、術前の診断には使用されていないものである。そこで、平成 23 年と 24 年の 2 年間において、術前に診断基準を用いて、臨床スコアを計算し、その後手術治療を行い確定診断をし、この診断基準が本当に有用であるか検討した。

またステロイドしか有効な手段がない現在、新しい治療標的分子の同定も急務である。そこで鼻茸を用いた網羅的な解析を行い検討することとした。

B. 研究方法

平成 23 年 1 月から平成 24 年 12 月の間、各施設において行われる副鼻腔炎手術症例において、レントゲン、内視鏡検査、各種聴力検査、細胞診、鼻汁・中耳好酸球検査、末梢血液像、一般採血、CT を行い、完全な臨床データ作成

(図 1) と診断基準による術前診断を行った。さらに網羅的解析用末梢血と血清を回収した。手術終了後、データシートを回収し福井大学に集め、データを入力、慈恵医大で解析した。好酸球性副鼻腔炎診断の重み付けに則り、各症例のスコアを算出した後、術後の病理診断と最終的に比較検討した。さらに重み付けを適応し、診断の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を検討した。

摘出した鼻茸は、網羅的蛋白解析と次世代シーケンサーによる網羅的 RNA 発現解析を行った。手術中に鼻茸組織を採取し、すぐに液体窒素中で凍結保存した。RIPA バッファーで蛋白を抽出し、IgG 除去キットを用いて蛋白精製を行った。蛋白濃度を一定に揃えた後、DIGE 用のバッファーへバッファー変換を行った。Ettan DIGE システムにより、8cm のゲルを用い、pH レンジを 4-7 の範囲で、2-DIGE 電気泳動を行った。Decyder により各スポットの発現強度を GeneSpring により解析した。統計的有意な変化を示しているスポットについて質量分析 (mass spectrometry) を行った。ゲルを銀染色し、目的のスポットを Ettan Spot Picker により切り出した後、MALDI-TOFMS: AXIMA-CFR plus を用いて解析、得られた Peptide mass fingerprint を Mascot データベースにより解析した。Mascot で得られた結果と Swiss-2DPAGE のデータが一致した、または複数回の MALDI-TOFMS→Mascot 解析により結果が再現された場合に同定したと判定した。

一方別に保存した鼻茸は、QIAzol を用い AGPC 法によって total RNA を抽出し、Ribo-Zero™Gold Kit を用いて rRNA を除去後、SOLiD™Total RNA-Seq Kit を用いてライブ

ラリーを作成した。次に Emulsion PCR 法にてライブラリーを増幅し、SOLiDTM 5500xl でシーケンシングを行った。LifescopTM Genomic Analysis Software を用いてゲノムマッピングを行い、Avadis NGS にてデータの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は福井大学医学部倫理委員会および各分担研究者施設の承認を得て行った。鼻粘膜細胞の採取も、患者さんから文書での研究材料使用承諾書を得て行った。

C. 研究結果

前向き研究は、574 例が登録された。うち術前での ECRS 診断は 33.8%であった。H22 の後ろ向き研究の時よりも ECRS の率が約 5% 増加した。血清 528 例、遺伝子解析に用いる全血 515 例、鼻茸 130 例が福井大学に送付され登録番号が付けられ保存された。現在検討中であるが、これまでの結果、短時間で再発をきたす重症群と一般的副鼻腔炎のように順調な経過をたどる軽症群に分かれることが判明した。

網羅的蛋白解析では、アスピリン喘息に伴う鼻茸で高発現をしていた L-plastin が ECRS の鼻茸においても高い発現を示していた。そこで免疫組織化学において、一般的慢性副鼻腔炎鼻茸、気管支喘息を伴う副鼻腔炎鼻茸、アスピリン喘息を合併する副鼻腔炎鼻茸の 3 群で浸潤している好酸球数と L-plastin の発現を検討した。すると一般的慢性副鼻腔炎鼻茸では、好酸球浸潤数は気管支喘息合併例、アスピリン喘息に比べ有意に低値を示した。すなわち気管支喘息を伴う副鼻腔炎鼻茸、アスピリン喘息を合併

する副鼻腔炎は ECRS であった。次に L-plastin 陽性細胞を調べた。すると一般的慢性副鼻腔炎鼻茸と気管支喘息合併鼻茸では、ほとんど差を認めなかった。一方で、アスピリン喘息を合併する副鼻腔炎鼻茸は、両群に比較して有意に L-plastin 陽性細胞が増加していた。L-plastin 陽性細胞は二重染色の結果、ほとんど好酸球であることが判明した。

次世代シーケンサーでは、36579 のゲノムマッピングを行い、全サンプルで低発現のものを除去し、ECRS と慢性副鼻腔炎で有意な発現差を認めるものを取り出すと、10 の既知遺伝子と 2 つの新規遺伝子が見つかった。また gene ontology 解析では、17 の候補遺伝子が見出され、線毛に関連するものが多く認められた。

D. 考察

平成 22 年に定めた診断基準は、より ECRS の可能性ある症例を拾い上げるに優れるように作成した。しかしスコアを高くしてもより重症な ECRS が選択されるわけではなかった。

この診断基準を作成した症例の診断は、各施設に任せていた。ECRS と診断した症例、ECRS 以外と診断した症例を集めて 3014 例となっており、ほとんどの施設は病理診断書のコメントに「多数の好酸球を認める」と書かれていること、これまで春名らが提唱してきた臨床所見との一致性から診断がなされていた。すなわち ECRS と診断したものからさらに積み上げて ECRS の診断基準を作成したことになる。このことは、正式な診断基準が決定していない疾患の疫学調査上、仕方のないことであるが、問題も残る。そこで平成 23 年から 24 年の 2 年間は、鼻茸や鼻粘膜の組織診断を受ける前に、ECRS か慢性副鼻腔炎かどうかを表 1 の診断

基準で決定後、術後病理標本で最終診断をするという、前向き研究を行うこととした。さらに ECRS には、①気管支喘息を合併していない群、②通常の気管支喘息合併群、③アスピリン喘息や Churg-Strauss 症候群の合併群、計 3 つの群に分類できることがわかってきた。この中で①気管支喘息を合併していない群は、術後成績が一般的慢性副鼻腔炎とほぼ同等かやや劣っている程度で ECRS では予後が良好であった。②通常の気管支喘息合併群では、成績は明らかに低下し、③アスピリン喘息や Churg-Strauss 症候群の予後は最も不良であった。すなわち②と③が重症 ECRS、もしくは真の ECRS であると言え、この診断基準の作成が最終的に必要となってきた。鼻茸組織における L-plastin 陽性好酸球浸潤は、見事にこの分類と一致していた。最も予後不良の重症 ECRS で L-plastin 陽性好酸球浸潤が多いことを示した。L-plastin は、actin binding protein の一つで、大腸がん細胞に発現し、癌浸潤の関与していることが証明されている。また好酸球の刺激サイトカイン GM-SCF にてリン酸化が起こることも報告されている。T 細胞の活性化や B 細胞のリンパ濾胞形成に重要とされている。これまで我々が行った L-plastin の機能解析では、GM-CSM による細胞移動と走化性、血管浸潤 in vitro モデルにおける血管浸潤の亢進に深く浸潤の方向に関与していることがわかっている。今後更なる研究を行い、ECRS の標的治療分子になりえないか同定していきたい。次世代シーケンサーでスクリーニングされた遺伝子 12 個と 17 個に関しては、免疫組織化学や細胞株での発現を調べながら、今後機能的解析へと進んでいく予定である。

E. 結論

ECRS にも重症度分類が必要である可能性が臨床的にも、また L-plastin の免疫組織化学を用いた病理組織学的にもみいだされた。

重症の ECRS が真の難治性 ECRS であると考えられるが、その診断基準は、3014 例の鼻茸再発を基準にした予後調査、また平成 23 年からの前向き研究での予後調査で、作成可能であると考えている。

作成した診断基準や臨床所見は、これまで多くの学会、研究会で発表しているの、かなりの啓蒙活動はできていると思われる。今後プライマリー医師でも、ECRS の可能性が見出せる診断手引きも必要であると考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP: Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 [Epub ahead of print]

2) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Cho SH, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP: Excessive fibrin deposition in nasal polyps

caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187(1):49-57.

3) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP: Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 ; 130(2):410-20.e5.

4) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M.: Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012; 44(11):1222-6.

5) Yamada T, Yamamoto H, Kubo S, Sakashita M, Tokunaga T, Susuki D, Narita N, Ogi K, Kanno M, Yamashita S, Terasawa Y, Kayano Y, Masada M, Fujieda S.: Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with

perennial allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 2012; 33(2):e9-16.

6) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M.: Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy.* 2013; 68(1):92-100.

7) Kubo S, Yamada T, Osawa Y, Ito Y, Narita N, Fujieda S.: Cytosine-phosphate-guanosine-DNA induces CD274 expression in human B cells and suppresses T helper type 2 cytokine production in pollen antigen-stimulated CD4-positive cells. *Clin Exp Immunol.* 2012;169(1):1-9.

8) Yamamoto H, Yamada T, Sakashita M, Kubo S, Susuki D, Tokunaga T, Ogi K, Terasawa Y, Yamashita S, Kayano Y, Masada M, Kimura Y, Fujieda S.: Efficacy of prophylactic treatment with montelukast and montelukast plus add-on loratadine for seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 2012;33(2):e17-22.

9) Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(1):184-94. e11.

- 10) Fujieda S, Kurono Y, Okubo K, Ichimura K, Enomoto T, Kawauchi H, Masuyama K, Goto M, Suzaki H, Okamoto Y, Takenaka H.: Examination, diagnosis and classification for Japanese allergic rhinitis: Japanese guideline. *Auris Nasus Larynx*. 2012 Dec;39(6):553-6. Epub 2012 Mar 7.
- 11) Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, Hsi E, Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M.: ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One*. 2012;7(1):e29387.
- 12) Yamada T, Saito H, Kimura Y, Kubo S, Sakashita M, Susuki D, Ito Y, Ogi K, Imoto Y, Fujieda S. CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. *Cytokine*. 2012;57(2):245-50.
- 13) Osawa Y, Suzuki D, Ito Y, Narita N, Ohshima Y, Ishihara Y, Ishihara Y, Tsuchida S, Fujieda S.: Prevalence of inhaled antigen sensitization and nasal eosinophils in Japanese children under two years old. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012;76(2):189-93.
- 14) 藤枝重治, 坂下雅文, 鈴木弟, 富田かおり, 徳永貴広 : 鼻茸 *JOHNS* 2012; 28:1105-10
- 15) 藤枝重治, 坂下雅文 : 好酸球性副鼻腔炎とアスピリン喘息の治療とステロイドの位置づけ *ENTONI* 2012; 139:73-80.
2. 学会発表
- 1) Susuki D, Tanaka Y, Ito Y, Yamada T, Nomi N, Kodama S, Suzuki M, Tsukidate T, Haruna S, Fujieda S. Proteomics analysis of nasal polyps in aspirin intolerant asthma (AIA) and chronic rhinosinusitis (CRS). The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, April, 13, 2012, Kyoto.
- 2) Fujieda S, Susuki D, Tanaka Y, Tsukidate T, Haruna S, Yamada T. Proteomics analysis of nasal polyps from patients with aspirin intolerant asthma (AIA). *Collegium oto-rhino-laryngologicum micitiae sacrum*. August 27, 2012, Roma.
- 3) 鈴木 弟 : アスピリン不耐症患者と慢性副鼻腔炎患者における鼻茸の相違-網羅的蛋白解析による検討- 第 51 回日本鼻科学会総会・学術講演会 シンポジウム 千葉市 2012. 9.28. 千葉
- 4) Fujieda S.: Eosinophilic chronic rhinosinusitis. The 45th congress of the Korean Rhinology Society. Sepecial lecture Seoul 2013, 3.10
- 5) 藤枝重治 : 併存症としての鼻・副鼻腔炎 (好酸球性中耳炎を含む) 第 53 回日本期間呼吸器学会 東京 2013.4.21

6) 藤枝重治：好酸球性副鼻腔炎の取り扱い
第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会 札幌
2013.5.16

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ケースカード:慢性好酸球性炎症疾患

(施設番号) E (整理番号)

性別(M F) 年齢 ___才 生年月日 _____

□H22 疫学参加あり、前回番号()-()

□慢性副鼻腔炎 □好酸球性副鼻腔炎

□慢性中耳炎 □好酸球性中耳炎

記入時状況 □手術前 □外来管理

発症年齢

□<10 □10-19 □20-39

□40-49 □50-59 □60<

病変 □片側 □両側

術前状況

術前、2週以内の内服ステロイド使用
(あり(増悪時屯用含む) なし)

抗菌薬への反応 (あり なし 使用なし)

ステロイドへの反応
点鼻 (あり なし 使用なし)
内服 (あり なし 使用なし)

身体所見について

鼻茸 (あり なし)
粘稠な鼻汁 (あり なし)
後鼻漏 (あり なし)
顔面痛 (あり なし)
嗅覚障害 (脱失、あり なし)
嗅裂閉塞 (あり なし)
滲出性中耳炎 (あり なし)
ニカワ状中耳貯留液 (あり なし)
骨導閾値上昇(1周波数でも 30dB 以上)
(あり なし 未測定)

術後再発傾向について (あり なし)

鼻茸 粘稠な鼻汁 後鼻漏 顔面痛 嗅覚障害
嗅裂閉塞 滲出性中耳炎 ニカワ状中耳貯留液
骨導閾値上昇 (複数回答可)

喫煙について

□今まで喫煙歴なし □以前ある(本/日、年間)

□現在ある(本/日、年間)

室内ペット飼育 (受診時あり 以前あり なし)

この症例の診断は、(各施設での基準で診断)

採血について

採血日 _____ □手術前 □外来管理
採血時、2週以内の内服ステロイド使用
(あり なし)

呼吸機能検査について □手術前 □外来管理

FVC 実測 _____ml 予想の _____%

FEV1.0 実測 _____ml 予想の _____%

上顎洞と篩骨洞の陰影濃度(Lund-Mackay: 0, 1, 2)

	F	AE	PE	M	S	OMC	OC
Rt							
Lt							

標本所見について 好酸球数(x400、一視野あたり)

① _____個 ② _____個 ③ _____個 平均 _____個

術中ステロイド使用 (あり なし)

合併症について

好酸球性中耳炎 (+ -)
好酸球性筋膜炎 (+ -)
好酸球性食道炎 (+ -)
好酸球性胃腸炎 (+ -)
好酸球性肺炎 (+ -)
好酸球性膿疱性毛包炎 (+ -)
慢性中耳炎 (+ -)
アスピリン喘息 (+ -)
アレルギー性鼻炎 (+ -)
気管支喘息 (+ -)
アトピー性皮膚炎 (+ -)
食物アレルギー (+ -)
蕁麻疹、薬剤アレルギー (+ -)
(薬剤名)
Churg-Strauss syndrome (+ -)

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))
分担研究報告書

好酸球性炎副鼻腔炎の病態形成における肥満細胞の役割に関する研究

研究代表者 藤枝重治 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授
研究協力者 高林哲司 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教

研究要旨

過度の Th2 炎症による組織への好酸球浸潤の制御は好酸球性副鼻腔炎の治療法確立にとって極めて重要なテーマである。肥満細胞は生体が外界に接する至る所に存在し生体防御機構の中心的な役割を担っている。肥満細胞の活性化は Th2 炎症を蜂起することが知られているが、その存在部位によってサブタイプが異なり、発現するプロテアーゼを初め産生するサイトカイン、脂質代謝産物、更には薬剤に関する反応性も異なることから、病変における肥満細胞のサブタイプを明らかにすることは非常に重要である。我々は鼻内内視鏡手術症例 203 例から得られたサンプルをコントロール群、鼻茸を伴わない慢性副鼻腔炎群、鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎群の鈎状突起粘膜、および鼻茸組織の 4 群に分け、肥満細胞の分布を検討した。その結果、鼻茸組織においてその上皮と腺上皮で肥満細胞数が著明に増加していた。上皮における肥満細胞はそのプロテアーゼの発現パターンが tryptase(+), Chymase(-), CPA3(+) の従来の分類法である組織型と粘膜型のいずれにも当てはまらないタイプであった。また鼻茸の腺上皮に集積が見られた肥満細胞は 3 つのプロテアーゼ全て陽性のいわゆる組織型肥満細胞であった。

A. 研究目的

肥満細胞は抗原特異的 IgE のクロスリンクによって脱顆粒し、ヒスタミンを初めとしたケミカルメディエーターを放出することによってアレルギー反応の即時相に関与することが古くから知られている。一方、マウスモデルを用いた検討において肥満細胞を欠損させることによって組織への好酸球の浸潤が著しく阻害されることが報告されている。さらに T, B cell を活性化することによって獲得免疫にも関与し、特に T cell に対しては OX40L を介して抗原提示を行い、Th2 炎症を誘導することも知られている。肥満細胞が放出

するサイトカインやケモカインは、Th2 誘導性のものが多いことから、肥満細胞は好酸球性副鼻腔炎における Th2 環境の形成に大きく関与していることが予想される。また臨床試験において好酸球の分化、生存に必須の IL-5 の分子標的治療薬である Mepolizumab を患者に投与することによって、鼻茸が著しく縮小したという報告もあることから、好酸球性副鼻腔炎において肥満細胞を起点とした Th2 炎症の誘導から鼻粘膜への過剰な好酸球浸潤に至るまでのメカニズムを解明することは、現在ステロイドの全身投与が治療の中心である本疾患に対する根本的な治療法の確立に

非常に有益であると考えられる。

肥満細胞は生体が外界と接する至るところに存在するが、その存在部位によってサブタイプが異なっている。それらは含有するプロテアーゼの表現形から粘膜型(MC-T)、組織型(MC-TC)に分類され、産生する脂質代謝産物、サイトカインや補対に対する反応性、IgE レセプターの発現量、更にはステロイドを含めた薬剤に対する反応も異なっている。実際にアレルギー性の気管支喘息や花粉症では粘膜型が多く、重症の気管支喘息や関節リウマチ、アトピー性皮膚炎では組織型が優位であると言われている。これらの事から病変における肥満細胞のサブタイプを明らかにすることは病態メカニズムの解明に有効であり、特に Th2 炎症主体の好酸球性副鼻腔炎において、炎症の起点となる肥満細胞の動態や性状を検討することは本疾患の病態の解明、治療戦略の確立において極めて重要である。しかし、慢性副鼻腔炎における肥満細胞の検討は系統立てて行われたものが少なく、その検討もほとんどが免疫組織化学によるもので定量性に乏しい事は否めない。また鼻茸組織は中鼻道周辺の粘膜に限局して発生するにも関わらず、多くの検討ではコントロールとして下甲介粘膜が使われていることも結果を複雑にしている原因のひとつである。今回の検討では鼻茸の有無で分類した慢性副鼻腔炎の鼻粘膜における肥満細胞の定量、および部位による肥満細胞のサブタイプを明らかにし肥満細胞を起点とした好酸球性副鼻腔炎の病態形成メカニズムの解明を目的とした。

B. 研究方法

脳外科において経鼻的に行われた手術症例で

鼻副鼻腔疾患無しのコントロール 42 例、また耳鼻咽喉科医による鼻内内視鏡手術症例で鼻茸を伴わない慢性副鼻腔炎 70 例、好酸球性で鼻茸を伴う慢性副鼻腔炎 91 例を対象とした。

以上の様に分類した症例から鼻腔洗浄液、鼻粘膜擦過による粘膜上皮、および鼻内内視鏡手術時に鈎状突起、鼻茸組織を採取した。これらのサンプルを用いて real time PCR にて遺伝子の発現量の測定、ELISA による蛋白の定量、肥満細胞のプロテアーゼに対する抗体を用いて免疫組織化学、および蛍光二重染色による各種プロテアーゼの共局在判定を行った。

(倫理面への配慮)

全ての対象者には本研究の目的を口頭、文書両方で説明し、同意を得ている。また本研究は大学倫理委員会の認可を得ている。サンプルから患者を同定できないようにサンプルをランダムに番号化して検討を行った。

C. 研究結果

Tryptase を肥満細胞のマーカーとして用いて検討を行った。鼻粘膜における tryptase と好酸球活性化のマーカーである eosinophil cationic protein (ECP)の蛋白発現レベルは有意に正の相関を示したことから、肥満細胞は鼻粘膜組織における好酸球浸潤に関与することが示唆された。組織全体、および上皮における tryptase 遺伝子の発現が鼻茸において有意に増加していた。また組織、および鼻腔洗浄液を用いた ELISA による検討でも同様に鼻茸において tryptase 発現の優位な増加が認められた。免疫組織化学で肥満細胞が、鼻茸の主に上皮および腺上皮に有意に集積数が増

加していることが分かった。

肥満細胞のプロテアーゼのひとつである chymase 遺伝子の発現は、組織全体および上皮のいずれにおいても3群に分類した慢性副鼻腔炎において有意な違いは無かった。ただし免疫組織化学で、鼻茸の腺上皮に chymase 陽性の肥満細胞の集積増加を認めた。さらに肥満細胞のプロテアーゼである carboxypeptidase A3 (CPA3) 遺伝子の発現は、鼻茸において組織全体および上皮で有意に増加していた。また免疫組織化学では、CPA3 陽性の肥満細胞が鼻茸の主に上皮および腺上皮に有意に集積数が増加していた。

蛍光二重染色による検討にて鼻茸の上皮に集積していた肥満細胞は、プロテアーゼの発現タイプが tryptase+, chymase-, CPA3+ であり、これまでの分類には当てはまらないユニークなタイプであることがわかった。また腺上皮に集積していた肥満細胞は、tryptase+, chymase+, CPA3+ の組織型であることも判明した。

D. 考察

本検討では、慢性副鼻腔炎の鼻粘膜組織における肥満細胞の分布、サブタイプについて詳細な検討を行った。好酸球性副鼻腔炎の鼻茸において、肥満細胞数が有意に増加すること、またその増加は鼻粘膜上皮と腺上皮において著明であることが分かった。鼻粘膜上皮に肥満細胞が集積するメカニズムは良く分かっていないが、今回の検討で鼻粘膜において stem cell factor (SCF) と tryptase の発現が有意に正に相関することを発見し、さらに eotaxin-1,2,3 それぞれの発現も同様に tryptase と有意に正の相関を示した。一般に肥満細胞は eotaxin のレ

セプターである CCR3 を発現していると言われていたので、好酸球性副鼻腔炎における Th2 優位の環境が上皮からの eotaxin の産生を誘導し、これが肥満細胞の上皮への集積に関与していると考えられる。また SCF は肥満細胞の分化、増殖、生存に必須であり、Th2 環境下では上皮における発現が亢進することが知られている。鼻粘膜に集積した肥満細胞は、SCF によって更に分化、増殖し、Th2 環境の positive feedback loop を形成すると考えられる。

鼻茸組織の鼻粘膜上皮に集積する肥満細胞のプロテアーゼの発現が tryptase+, chymase-, CPA3+ とこれまでの分類にあてはまらないユニークなものであった。最近他の Th2 炎症性疾患でも同様の報告がなされたが、なぜ上皮に集積した肥満細胞がこの様な表現系を示し、そして疾患の病態形成にどう関与するのかという事はよく分かっていない。Real time PCR のデータでは、鼻茸上皮における tryptase の発現量は組織全体のものと比べて10倍以上多い事から、単に肥満細胞数が増加しているだけではなく tryptase の発現自体も増加しているものと予想される。近年カビやいくつかの抗原のプロテアーゼが、気道上皮に発現している protease activated receptor-2 (PAR-2) を刺激することによって、組織における Th2 炎症に重要な役割を果たしていると報告されている。Tryptase もまたそのプロテアーゼによって PAR-2 を活性化し、鼻茸上皮における tryptase の発現量の増加は PAR-2 を介した Th2 環境形成に深く関与していると考えられる。また血管内皮細胞にも PAR-2 が発現しており、tryptase の刺激によって血管透過性が亢進し、鼻茸における血漿蛋白の異常沈着による過度な浮腫を形成すると思われる。肥満細胞が

組織内の繊維化を促すことは古くから知られているが、繊維化の低形成は好酸球性副鼻腔炎の鼻茸の病理学的な特徴のひとつである。肥満細胞が著しく増加しているにもかかわらず、組織における繊維化が起きない理由として、chymase の発現減少が原因のひとつではないかと考えている。

Chymase は TGF- β の発現および活性化を誘導し、組織の繊維化を促す働きがある。鼻茸上皮に増加していた肥満細胞は、chymase の発現が少ないため繊維化の形成が起きにくい可能性がある。また chymase は Th2 サイトカインを分解し炎症を収束させる事も知られており、chymase の低下が Th2 炎症の遷延化にも関与しているだろう。

今回の検討で発見した鼻茸の腺上皮における肥満細胞の浸潤が増加しており、その肥満細胞が組織型のサブタイプを示していたことは最も重要な所見の一つである。好酸球性副鼻腔炎の臨床症状の一つに粘調性分泌液の貯留があげられるが、これは本疾患を患う患者にとって極めて不愉快な症状である。更に粘液貯留は、様々な治療に抵抗し、本疾患の治療法を考える上で、非常に重要なものであると思われる。組織型肥満細胞は、シクロオキシゲナーゼ経路を介したプロスタグランジン D2 (PGD2) を産生し、これが MAC5B を誘導するとともに腺組織による粘液産生に関与している。また chymase 自身も腺組織における粘液産生を促す働きがあるという報告もあり、鼻茸腺組織に集積した組織型の肥満細胞が、好酸球性副鼻腔炎における粘調性分泌液の貯留亢進に関与している可能性が高い。

E. 結論

好酸球性副鼻腔炎における鼻茸において上皮と

腺組織に肥満細胞の浸潤が多く見られ。それぞれ発現するプロテアーゼが異なっていた。組織における肥満細胞のサブタイプの違いは好酸球性副鼻腔炎に特徴的な病理組織や臨床症状の形成に深く関与していることが予想された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tetsuji Takabayashi, Atsushi Kato, Anju Peters, Kathryn E. Hulse, Lydia A. Suh, Roderick Carter, James Norton, Leslie C. Grammer, Seong H. Cho, Bruce K. Tan, Rakesh K. Chandra, David B. Conley, Robert C. Kern, Shigeharu Fijieda, and Robert P. Schleimer: Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*, 130(2) 410-25, 2012.

2. 学会発表

1) Tetsuji Takabayashi, Atsushi Kato, Anju Peters, Kathryn E. Hulse, Lydia A. Suh, Roderick Carter, James Norton, Leslie C. Grammer, Seong H. Cho, Bruce K. Tan, Rakesh K. Chandra, David B. Conley, Robert C. Kern, Shigeharu Fijieda, and Robert P. Schleimer: Mast cells with a unique phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI)*, Orlando, 2012,3.

2) 高林哲司. 好酸球性副鼻腔炎の病態形成にお

ける肥満細胞の役割. 第 25 回日本アレルギー学会
春季臨床大会 シンポジウム, 横浜, 2013. 5.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))
分担研究報告書

RNA-Seq を用いた好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定に関する研究

研究分担者	野口 恵美子	筑波大学遺伝医学	准教授
研究協力者	徳永 貴広	福井大学耳鼻咽喉科	大学院生

研究要旨

好酸球性副鼻腔炎は難治性の副鼻腔疾患であるが、その病態についてはいまだ不明な点が多い。本研究では次世代シーケンサーを使用した RNA-Seq を好酸球性副鼻腔炎、慢性副鼻腔炎患者の鼻茸から抽出した RNA を用いて行った。好酸球性副鼻腔炎患者において有意に発現が上昇・低下している複数の遺伝子が同定された。また、慢性副鼻腔炎患者の発現解析パターンは2つにわかれ、同じ慢性副鼻腔炎患者の中にもサブタイプに分かれる可能性が示唆された。

A. 研究目的

好酸球性副鼻腔炎は難治性の副鼻腔疾患であるが、その病態についてはいまだ不明な点が多い。本研究では新しい手法である RNA-Seq を用いて、好酸球性副鼻腔炎と関連する遺伝子を同定し、病態解明にせまることを目的とする。

(倫理面への配慮)

患者に対して研究に対する説明を行い、研究参加に対するインフォームドコンセントを取得した。本研究は福井大学および筑波大学の倫理委員会の承認を得て行われた。

B. 研究方法

手術時に採取された好酸球性副鼻腔炎または慢性副鼻腔炎の鼻茸から RNA を抽出し、リボゾーマル RNA の除去後、SOLiD™ Total RNA-Seq Kit を用いてライブラリの作成を行った。SOLiD5500(Life Technologies)を使用してシーケンスを行い、得られたデータを SOLiD に付属している LifeScope version 2.5(Life Technologies)を用いてマッピングした。得られた Bam ファイルを使用して Avadis NGS (Agilent)による二次解析を行った。

C. 研究結果

慢性副鼻腔炎と比較して、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸に有意に高く発現している3遺伝子を同定した。正常鼻上皮細胞との比較では、好酸球性副鼻腔炎で有意に高く発現しているが、末梢血好酸球では発現していない遺伝子は、784存在していた。慢性副鼻腔炎と分類された4サンプルの中で、RNA-Seq において発現プロファイルの異なる2群が認められた。その2群間で発現の異なる遺伝子は、線毛や線毛軸糸に関連する遺伝子群であった。

D. 考察

発現差が認められた遺伝子について、今後別の手法を用いてバリデーションを行う予定である。慢性副鼻腔炎と分類された患者の中で、線毛の構造や機能が異なる2群が存在することが示された。しかし、上記2群間で、症状や診断基準スコアに違いは認められなかった。

線毛に関連した遺伝子の発現が異なる原因としては、以下の可能性がある

- ①生来発現が異なり、発症に影響を与えている。
- ②発症するまでの、感染や抗原暴露が発現に影響を与えている。
- ③鼻茸形成過程において、発現が変化する。

今後はさらにサンプルサイズを増やして検討する予定である。

E. 結論

慢性副鼻腔炎と比較して、好酸球性副鼻腔炎の鼻茸に有意に高く発現している3遺伝子を同定した。

慢性副鼻腔炎と分類された4サンプルの中でRNA-Seqにおいて発現プロファイルの違う2群が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura

K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M: Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*, 44:1222-6, 2012.

2) Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N: A Distinct Sensitization Pattern Associated with Asthma and the Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Genotype. *Allergol Int*, 2012.

3) Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, Yamada H, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N: Asthma Phenotypes in Japanese Adults - Their Associations with the CCL5 and ADRB2 Genotypes. *Allergol Int*, 2012.

4) Ono M, Hamada Y, Horiuchi Y, Matsuo-Takasaki M, Imoto Y, Satomi K, Arinami T, Hasegawa M, Fujioka T, Nakamura Y, Noguchi E: Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a Sendai virus vector. *PLoS One*, 7:e42855, 2012.

5) Saito M, Kamoda T, Nishimura K,

Miyazono Y, Kanai Y, Kato Y, Iwabuchi A, Fukushima H, Hamada H, Arinami T, Sumazaki R, Noguchi E: Association of adiponectin polymorphism with cord blood adiponectin concentrations and intrauterine growth. J Hum Genet, 57:109-14, 2012.

カー 特許第 5176229 号

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 学会発表

1) 意元義政, 野口恵美子, 徳永貴広, 山田武千代, 藤枝重治: 鼻粘膜におけるスギ花粉症発症関連遺伝子の解析. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012,11.

2) 谷田貝洋平, 増子裕典, 山田英恵, 金子美子, 透坂, 飯島弘晃, 内藤隆志, 野口恵美子, 藤枝重治, 坂下雅文, 意元義政, 広田朝光, 玉利真由美, 哲今, 西村正治, 檜澤伸之: 日本人血清総 IgE 値のゲノムワイド関連解析. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012,11.

3) 徳永貴広, 意元義政, 野口恵美子, 有波忠雄, 藤枝重治: 次世代シーケンサーを用いた Whole Transcriptome 解析によるスギ花粉症関連遺伝子の同定. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 大阪, 2012,11.

4) 野口恵美子: 次世代シーケンサーのアレルギー疾患研究への応用. 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 大阪, 2012,5.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

アレルギー疾患の治療薬且つ治療効果のマー